



ISBN: 978-987-46406-2-8



LIBRO DE RESÚMENES 2017



II Reunión Transdisciplinaria en CIENCIAS AGROPECUARIAS 2017

XVIII Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2017 Facultad de Ciencias Veterinarias
V Jornada Latinoamericana
III Jornadas de Ciencia y Tecnología 2017 Facultad de Ciencias Agrarias

Estudio comparativo de dos tipos de microscopía para el análisis cuantitativo de la microestructura de geles ácidos de proteínas de soja

^{1,2,3}Ingrassia, Romina; ^{3,4}Palazolo, Gonzalo; ¹Dabin, Mariel; ^{3,4}Wagner, Jorge; ^{1,2,3}Risso, Patricia

¹Cátedra de Física Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias. ²Cátedra de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR). ³CONICET. ⁴Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos (LIFTA), Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) romina_ingrassia@yahoo.com.ar

El aislado nativo proteico de soja (SPI) posee un elevado valor nutritivo y sus propiedades funcionales, entre ellas la gelación, son útiles para la obtención de productos alimenticios con características organolépticas y de estabilidad deseables. El SPI forma geles a pH cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas que los conforman, previa desnaturalización térmica, proceso base de postres ácidos semejantes al yogurt, conocido como “gelación fría” (Kinsella, 2001). Por otra parte, la fracción proteica de los sueros de soja (WSP), sobrenadante isoeléctrico de la preparación de aislados, está constituida mayoritariamente por la lectina conocida también como hemaglutinina, los factores antitripticos de Kunitz y Bowman-Birk, y enzimas como la α -amilasa, lipooxigenasa y ureasa (Sorgentini & Wagner, 1999). Estas proteínas aisladas del suero de soja, cuando están inactivadas, tienen un valor biológico comparable al de las proteínas de reserva que componen el SPI (Cheftel, Cuq, & Lorient, 1989). El objetivo de este trabajo fue analizar comparativamente la microscopía óptica convencional (COM) y la microscopía confocal de barrido láser (CLSM) para la evaluación cuantitativa de la microestructura de geles ácidos obtenidos a partir de mezclas de SPI con WSP. El SPI se obtuvo por precipitación isoeléctrica a partir de harina de soja desgrasada, no tratada térmicamente y desolventizada en condiciones suaves de acuerdo al método propuesto por Sorgentini & Wagner (Sorgentini & Wagner, 1999). El WSP se obtuvo a partir del sobrenadante remanente de la precipitación isoeléctrica del SPI por precipitación con sulfato de amonio (90% de saturación), diálisis contra agua destilada y posterior liofilización. Las soluciones acuosas de SPI (3%) y de sus mezclas con WSP (%SPI/%WSP: 2,25/0,75, 2,5/2,5, 0,75/2,25) se calentaron 5 min a 100°C, se enfriaron en baño de agua-hielo, y se dejaron equilibrar a temperatura ambiente. La gelación se indujo por acidificación lenta adicionando glucono-delta-lactona (GDL) a las soluciones proteicas para obtener una relación de concentraciones de GDL: proteína (R) de 0,5. Las muestras se dejaron gelificar durante 1 h a 35°C en placas LAB-TEK II (85 μ L y 200 μ L para OCM y CLSM, respectivamente). Para OCM se utilizó un microscopio óptico invertido (objetivo 100x) con cámara digital acoplada (zoom7,1x). Para el análisis por CLSM (zoom 4x y objetivo 40.0x) se utilizó el colorante Rodamina B en una relación Proteína/Rodamina de 600mg/1mg. Se obtuvieron imágenes de 10 sectores diferentes de los geles a partir de las cuales se obtuvo el diámetro promedio de los poros a través del análisis con el Programa Image J. Además, se utilizó el Programa Python para el análisis textural de las imágenes. Como parámetros de textura se determinaron: la entropía de Shannon (S), la suavidad (K), y la uniformidad (U) de escala de grises (Zheng, Sun, & Zheng, 2006). Tanto para OCM como para CLSM se observó un aumento significativo del tamaño medio de los poros al aumentar la proporción de WSP en los sistemas, de manera que los geles de SPI en presencia de proteínas séricas tendieron a ser menos compactos. Este incremento fue más evidente para los sistemas evaluados por CLSM (de $1,5 \pm 0,2 \mu$ m a $16 \pm 6 \mu$ m) que para los evaluados por OCM ($1,2 \pm 0,2 \mu$ m a $2,1 \pm 0,5 \mu$ m). Como se muestra en la Figura 1, los valores de S obtenidos a partir de las imágenes adquiridas por OCM aumentan significativamente ($p < 0,05$) a medida que se incrementa la fracción de WSP en las mezclas. Esta tendencia estaría indicando una disminución en la interconectividad de la red proteica asociada a un aumento en el diámetro promedio de poros. Sin embargo, las imágenes obtenidas por CLSM presentaron un comportamiento opuesto y significativo solo a la mayor proporción de WSP ($p < 0,05$). Esto puede explicarse teniendo en cuenta que las proteínas están formando parte de agregados cada vez de mayor tamaño y, por ende, se encuentran en concentraciones locales cada vez más elevadas en todo el volumen del sistema. Es sabido que para CLSM es necesaria la utilización de un colorante fluorescente para lograr la visualización de proteínas (Rodamina B), y que las imágenes son obtenidas a través de cortes (plano xy) a diferentes profundidades de las muestras (eje z). En consecuencia, la distribución del color rojo se va perdiendo a lo largo y a lo ancho de la imagen debido a que el colorante se encuentra asociado a las

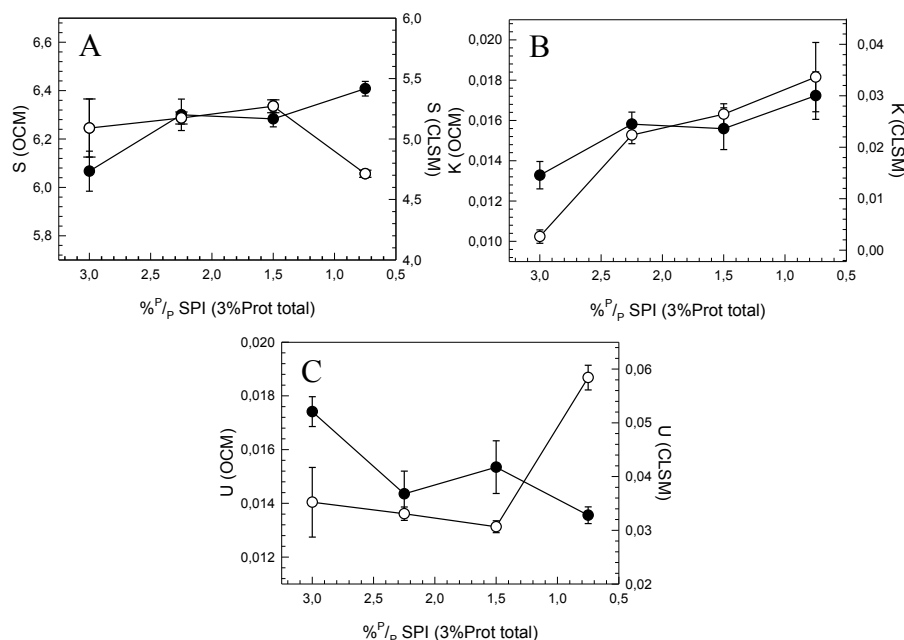


Figura 1. Parámetros de textura correspondientes a imágenes de geles ácidos de SPI y sus mezclas con WSP a diferentes relaciones proteicas (3% Prot total) obtenidas por OCM (●) y CLSM (○). R 0,5, T 35°C.

cadenas polipeptídicas que conforman dichos agregados. Por lo tanto, la variabilidad e intensidades de la escala de grises de la imagen es menor y S disminuye. Por otra parte, los valores obtenidos de U presentan tendencias exactamente opuestas a las observadas para el parámetro S en OCM y CLSM, debido a que su valor aumenta con la falta de variabilidad del histograma de grises de las imágenes. Por último, se observa que para ambas técnicas microscópicas el parámetro K aumenta a medida que la cantidad relativa de WSP se incrementa. En conclusión, independientemente de la metodología aplicada para la obtención de las imágenes, K es el único estimador que representa con mayor fidelidad la influencia de la presencia de WSP en el grado de empaquetamiento de los geles ácidos de SPI. El procedimiento basado en la determinación de parámetros de textura de imágenes obtenidas por OCM demostró ser más adecuado para la evaluación de cambios en la microestructura de geles ácidos de SPI/WSP debido a que los 3 estimadores propuestos representaron en mejor medida los cambios observados en el entramado proteico. Además, esta técnica no presenta otras desventajas asociadas a CLSM, como la necesidad de personal especializado para el manejo del equipo y la utilización de marcadores fluorescentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cheftel, J.-C., Cuq, J. L., & Lorient, D. (1989). Proteínas Alimentarias. In A. S. A. (Ed.). Zaragoza.
2. Kinsella, J. E. (2001). Functional Properties of Soy Proteins. *Journal of American Oil Chemical Society*, 56, 242-258.
3. Sorgentini, D. A., & Wagner, J. R. (1999). Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 23(5), 489-507.
4. Zheng, C., Sun, D.-W., & Zheng, L. (2006). Recent applications of image texture for evaluation of food qualities - a review. *Trends in Food Science and Technology*, 17(3), 113-128.

Estudio comparativo de dos tipos de microscopía para el análisis cuantitativo de la microestructura de geles ácidos de proteínas de soja

1,2,3,*Ingrassia, Romina; 3,4Palazolo, Gonzalo G.; 1Dabin, Mariel A.; 3,4Wagner, Jorge R.; 1,2,3Risso, Patricia H.

¹Cátedra de Física Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias. ²Cátedra de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR). ³CONICET. ⁴Laboratorio de Investigación en Funcionalidad y Tecnología de Alimentos (LIFTA), Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes (UNQ)

*E-mail: romina_ingrassia@yahoo.com.ar



Introducción

Aislado nativo proteico de soja (SPI)

Compuesto por las proteínas de reserva de la soja. Posee un elevado valor nutritivo y sus propiedades funcionales, entre ellas la gelación, son útiles para la obtención de productos alimenticios con características organolépticas y de estabilidad deseables

Aislado proteico de suero de soja (WSP)

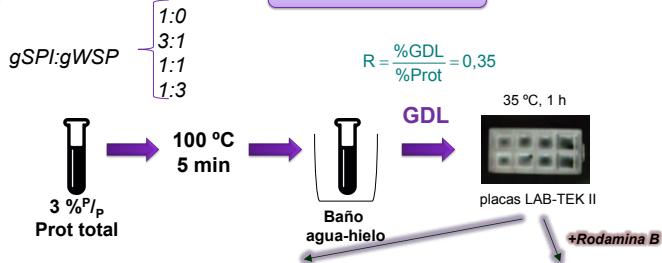
Obtenido a partir del sobrenadante isoelectrico de la preparación de SPI. Constituido mayoritariamente por lectina y factores antitripticos de Kunitz y Bowman-Birk. Cuando sus proteínas están inactivadas presenta tienen un valor biológico comparable al del SPI

La **gelación ácida** de proteínas es utilizada por la industria alimentaria y puede ser inducida por la adición de glucono-δ-lactona (GDL), promoviendo una reducción lenta del pH. Diferentes factores pueden afectar la velocidad del proceso y, como consecuencia, la microestructura de los geles formados.



Objetivo: analizar comparativamente la microscopía óptica convencional (OCM) y la microscopía confocal de barrido láser (CLSM) para la evaluación cuantitativa de la microestructura de geles ácidos obtenidos a partir de mezclas de SPI con WSP

Materiales y Métodos



Microscopía Óptica Convencional (OCM)



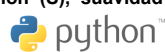
Microscopía Confocal de Barrido Láser (CLSM)

Diámetro medio de poros

Parámetros de textura de imágenes: entropía de Shannon (S), suavidad (K), y uniformidad (U)



Image Processing & Analysis in Java



Análisis Cuantitativo

Conclusiones

•K es el único estimador que representa con mayor fidelidad en ambas técnicas la influencia de la presencia de WSP en el grado de empaquetamiento de los geles ácidos de SPI.

•OCM demostró ser más adecuada que CLSM para la evaluación de cambios en la microestructura de geles ácidos de SPI/WSP debido a que los 3 estimadores representaron mejor los cambios observados en el entramado proteico. Además, esta técnica no presenta otras desventajas asociadas a CLSM, como la necesidad de personal especializado para el manejo del equipo y la utilización de marcadores fluorescentes.

Resultados y Discusión

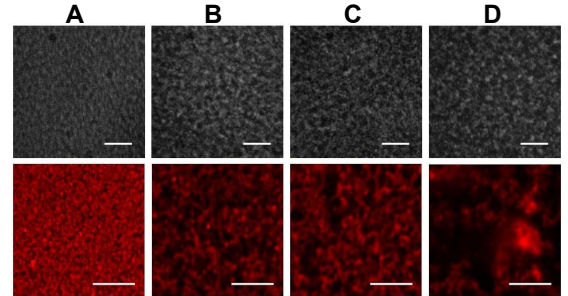


Figura 1. Imágenes digitales obtenidas por OCM (arriba) y CLSM (abajo) de geles ácidos de 3 % P₁ de SPI (A) y sus mezclas con WSP para distintas relaciones proteicas SPI/WSP: 2,25/0,75 (B); 1,5/1,5 (C) y 0,75/2,25 (D). Las barras de escala indican 10 µm.

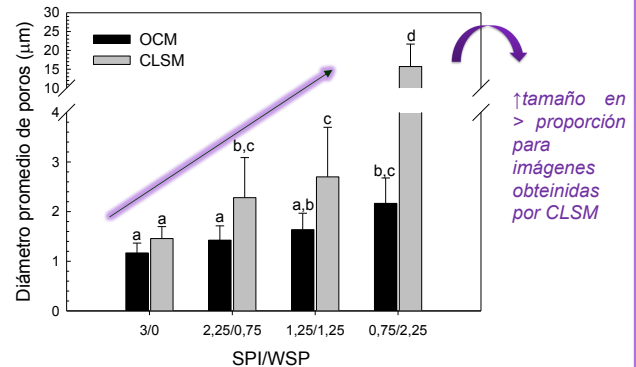


Figura 2. Valores de diámetros de poros para geles ácidos de SPI y sus mezclas con WSP (3% Prot total) de imágenes obtenidas por OCM y CLSM. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

OCM: $\uparrow S$ al $\uparrow WSP$

CLSM: solo cambia S (\downarrow) a la mayor proporción de WSP

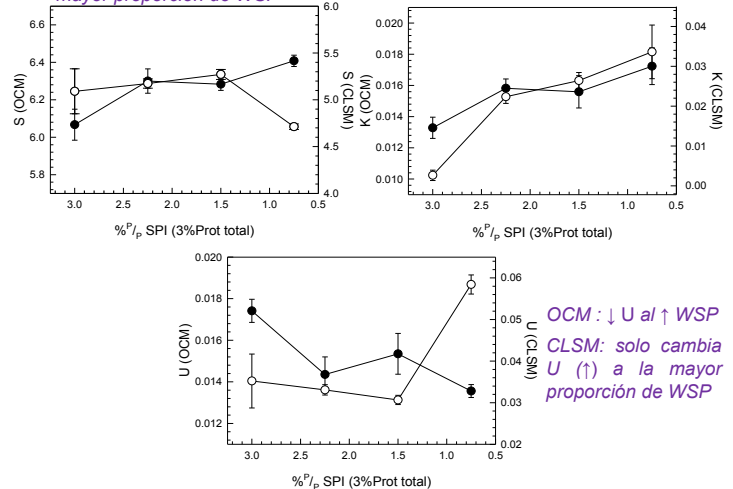


Figura 3. Parámetros de textura correspondientes a imágenes de geles ácidos de SPI y sus mezclas con WSP a diferentes relaciones proteicas (3% Prot total) obtenidas por OCM (●) y CLSM (○).

Las proteínas forman agregados cada vez de mayor tamaño al aumentar la proporción de WSP y, por ende, se encuentran en concentraciones locales cada vez más elevadas en todo el volumen del sistema.

En CLSM la distribución del color rojo se va perdiendo a lo largo y a lo ancho de la imagen debido a que el colorante se encuentra asociado a dichos agregados proteicos. Por lo tanto, la variabilidad e intensidades de la escala de grises de la imagen es menor.